



.ANEXO IV

JUSTIFICACION DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN DROGODEPENDENCIAS

MEMORIA CIENTÍFICA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

1ª ANUALIDAD

2ª ANUALIDAD

3ª ANUALIDAD

FINAL X

Número Expediente: DROG2011/021

Investigador Principal:

Roser Nadal Alemany

Otros Investigadores:

El equipo original era:

Antonio Armario García *

Jordi Ortiz de Pablo *

Javier Carrasco Trancoso

Sílvia Fuentes García

Pedro Garrido Vega

Humberto Antonio Gagliano *

Núria Daviu Abant

*Los únicos investigadores que formaban parte del equipo al finalizar el proyecto (8 mayo 2015). Los demás han participado en algún momento en el proyecto y han cursado baja.

Han colaborado también en el proyecto dos estudiantes de Máster (Abbi Hatto y Juan Navarro) y dos estudiantes de Grado (Manel Monsonet y Kilian Abellaneda).

Título Proyecto o subproyecto

Consecuencias de la negligencia y el maltrato infantil sobre la vulnerabilidad al alcoholismo: transmisión intergeneracional a través de modificaciones epigenéticas en la línea germinal paterna.

Título Proyecto coordinado en el que se integra (Sólo en caso de ser un subproyecto)

Organismo:

Universitat Autònoma de Barcelona

Centro:

Institut de Neurociències

Departamento: Psicobiología y Metodología de las Ciencias de la Salud (Facultad de Psicología).

Área Temática: Condiciones de vida y consumo de alcohol

Palabras Clave: Alcoholismo, Estrés temprano, Epigenética, Transmisión intergeneracional, Psicopatología, Ratas



RESUMEN: (objetivo, ámbito de estudio, sujetos de estudio, instrumentalización, resultados, conclusiones. Máximo 2000 palabras).

Las situaciones de maltrato y negligencia en humanos en etapas tempranas se asocian a un incremento en la etapa adulta de la probabilidad de desarrollar diversas psicopatologías, entre las que se encuentra la conducta adictiva. Nuestra propuesta inicial abordada, mediante un modelo animal, los efectos que se inducen en la descendencia en la etapa adulta tras una situación de estrés en la infancia sobre conductas relacionadas con la vulnerabilidad a la adicción alcohólica, la depresión y la ansiedad. Algunos de estos efectos proponíamos que se transmitirán a la siguiente generación, a través de la inducción de cambios epigenéticos en la línea germinal del macho. La propia exposición al alcohol proponíamos que exacerbaba los efectos transgeneracionales de las situaciones estresantes tempranas, mediante la propia inducción de cambios epigenéticos. Esperábamos que muchos de los efectos observados fueran marcadamente sexo-dimórficos.

Hemos realizado diversos experimentos con distintos modelos de estrés temprano, el cual en todos los casos ha inducido un incremento en la conducta materna que se realiza hacia las crías. En la etapa adulta se han encontrado diversos efectos “protectores” de forma sexo-dimórfica (en vez de los “negativos” esperados). La combinación de la exposición a estrés con el consumo (forzado mediante dieta líquida) de alcohol en los padres ha inducido en la descendencia efectos que no parecen demasiado consistentes. En uno de los experimentos realizados se encontró que la administración de alcohol en los padres disminuía la autoadministración operante (voluntaria) en la descendencia, mientras que en el segundo estudio (realizado para replicar los datos sorprendentes encontrados) no se encontró dicho efecto, aunque sí que la descendencia masculina mostraba una disminución en la autoadministración de sacarina. Los resultados indican globalmente que el tema es muy complejo pero que se requiere cambiar el esquema de pensamiento de que las experiencias tempranas “negativas” ejercen necesariamente efectos “negativos” en la descendencia. La explosión de datos en la literatura en el último par de años sobre efectos “protectores” de experiencias tempranas sugieren que probablemente estos son más frecuentes que lo que hace unos años se daba por asumido. Variables como la intensidad del estrés o la dosis de alcohol consumida probablemente nos ayudarán a predecir mejor el sentido de la dirección de dichos efectos transgeneracionales.



ARTÍCULOS PUBLICADOS COMO CONSECUENCIA DE LA ACCIÓN: Se adjuntará una separata de cada uno de ellos y se remitirá una copia en formato digital a pndinvestigacion@msssi.es para el fondo documental de la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas.

La convocatoria regula en su artículo décimo, punto 3 que la producción científica derivada del proyecto financiado debe ser comunicada a la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas y en cualquier tipo de publicación a que dé lugar, incluso páginas web, **se hará constar expresamente, de forma visible y preferencial que el proyecto se ha realizado con financiación de la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas.**

Publicaciones internacionales

Se ha publicado un artículo (se adjunta el pdf por correo electrónico y se envían impresas 3 separatas):

1. Fuentes S, Daviu N, Gagliano H, Garrido P, Zelena D, Monasterio N, Armario A, Nadal R. Sex-dependent effects of an early life treatment in rats that increases maternal care: vulnerability or resilience? *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2014, 25;8:56.

Se están finalizando dos artículos más que se enviarán cuando estén publicados:

2. Fuentes S, Daviu N, Garrido P, Gagliano H, Armario, Antonio, Nadal R. Long-term gender-dependent effects of an early life treatment in rats that increases maternal care in contextual fear conditioning and generalization of fear. To be submitted to: *Plos One*.
3. Fuentes S, Carrasco J, Hatto A, Navarro J, Armario A, Monsonet M, Ortiz J, Nadal R. An early life treatment that increases maternal behavior decreases incentive salience in a sex-dependent manner in rats. To be submitted to: *Behavioural Brain Research*.

Pósteres en congresos

1. Hatto A, Navarro J, Monasterio N, Monsonet M, Fuentes S, Ortiz J, Armario A, Nadal R, Carrasco J. The effect of reduced nesting material on CRF expression in offspring. *Jornadas Doctorales "Programa Mérimée"*. Montpellier, 2013.
2. Nadal R, Fuentes S, Carrasco J, Hatto A, Navarro J, Monsonet M, Ortiz J, Armario A. An early life treatment that increases maternal behavior decreases incentive salience in a sex-dependent manner in rats. *International Society of Developmental Psychobiology*, San Sebastián, Julio 2014.
3. Arnaldo L, Nadal R, Fuentes S, Armario A, Viveros MP, López-Gallardo M. Sex - dependent effects of unpredictable postnatal maternal stress plus maternal deprivation on glial cells, and CB1 cannabinoid receptor in the hippocampal formation of adult rats. Póster a presentar en la Reunión Científica de la Red de Trastornos Adictivos (ISCIII) y en el Congreso de la Sociedad Española de Neurociencias, Granada, Setiembre 2014.



Comunicaciones orales en congresos y conferencias

- Roser Nadal. Comunicación oral titulada “Entorno perinatal y sensibilidad biológica al contexto en modelos animales”. 2ª Reunión de la Sociedad Marcé Española, Barcelona, mayo 2013.
- Roser Nadal. Conferencia titulada “Efectos a largo plazo del entorno perinatal sobre la vulnerabilidad a la Psicopatología: una perspectiva desde los modelos animales”, Formación Continuada del Sistema Nacional de Salud, Hospital Clínico de Barcelona, enero 2014.
- Roser Nadal. Conferencia titulada “Experiencias estresantes tempranas y vulnerabilidad a la Psicopatología en la etapa adulta.” Seminarios internos, Hospital de la Santa Cruz y San Pablo, setiembre 2014.
- Roser Nadal. Conferencia titulada “Experiencias estresantes tempranas: vulnerabilidad o resistencia?” Primera Jornada de la CORE_UAB de Salud Mental, Hospital de la Santa Cruz y Sant Pablo, octubre 2014.
- Roser Nadal. Comunicación oral titulada “Early life experience: vulnerability or resilience?” 11th Symposium on Catecholamines and Other Neurotransmitters in Stress, Smolenice (Eslovaquia), junio 2015.
- Silvia Fuentes. Comunicación oral titulada “Efectos transgeneracionales del consumo de alcohol en la autoadministración operante de sacarina y de alcohol”. Jornadas de la Red de Trastornos Adictivos, Granada, setiembre 2015.
- Roser Nadal. Seminario sobre “Early life stress: vulnerability or resilience?” Erasmus Teaching Mobility Actions. Bordeaux (Francia), noviembre 2015.

Tesis de Máster

1. Hatto A. The long-term alterations in the dopaminergic system brought about by early and later life stressors are gender dependent. Programa de Máster en Neurociencias, UAB, 2013.
2. Navarro J. El estrés postnatal y el cuidado materno modifican la expresión de mRNAs relacionados con la respuesta al estrés, en el cerebro de rata adulta. Programa de Máster en Neurociencias, UAB, 2013.

Trabajos de fin de Grado

1. Abellaneda K. Transmissió intergeneracional dels efectes de l'estrès primerenc i del consum d'alcohol a partir de modificacions epigenètiques heretables. Facultat de Psicologia, UAB, 2014.
2. Koper M. Transgenerational epigenetics of stress resilience and vulnerability. Facultat de Psicologia, UAB, 2014.



Organización de Congresos

En fecha 27/07/2015 se ha notificado que me ha sido concedida una ayuda de [B-DEBATE](#) (“International Center for Scientific Debate, Barcelona”, Iniciativa BIOCAT/La Caixa) para la organización de un debate con ponentes internaciones con el título “Shaping a Healthy Adult: How early life experiences relate to psychopathology or wellbeing in adulthood”. Se realizará durante el 2016. Entre otros temas en el programa se incluye la transmisión intergeneracional del consumo de drogas y del estrés.



OBJETIVOS

PLANTEADOS: (Transcribir los del proyecto original)

Nuestras hipótesis y objetivos más específicos son:

- (1) El estrés temprano aumentará la vulnerabilidad al alcohol, potenciando la autoadministración operante de alcohol, así como la activación del eje HHA inducida por la droga.
- (2) El estrés temprano inducirá cambios a largo plazo en la conducta de las crías, incrementado la respuesta fisiológica al estrés (activación del eje HHA), la ansiedad (laberinto elevado en cruz o EPM, respuesta de sobresalto o ASR) y la conducta depresiva (conducta pasiva en la prueba de la natación forzada, apetencia reducida por soluciones dulces).
- (3) Los efectos a largo plazo del estrés temprano serían en gran parte mediados por cambios epigenéticos (metilación del DNA) en la regulación de genes clave en áreas importantes para la adicción y la conducta emocional (ver Metodología).
- (4) Al menos parte de los efectos conductuales y biológicos del estrés temprano se transmitirán a las siguientes generaciones (F2). La exposición al alcohol en la F1 interaccionará con el estrés temprano potenciando los efectos sobre la F2.
- (5) La transmisión transgeneracional sería mediada por modificaciones epigenéticas (metilación del DNA) que se transmitirán por la línea germinal paterna.

ALCANZADOS: (Ordenar de igual forma que los planteados. En el caso de proyectos coordinados, el coordinador deberá describir además el desarrollo de la coordinación entre subproyectos en este año, y los resultados de dicha coordinación con relación a los objetivos globales del proyecto).

La hipótesis 1 no se ha cumplido. El estrés temprano no ha aumentado la vulnerabilidad al alcohol.

Respecto a la hipótesis 2 hemos realizado distintos modelos de estrés temprano (3 tipos) y en todos los casos se han inducido muchos efectos “protectores” o adaptativos en la etapa adulta (y NO los “negativos” esperados). En todos los casos el estrés temprano ha resultado en un incremento de la conducta materna activa realizada hacia las crías. Estos efectos “beneficiosos” los interpretamos en la línea que el aumento en la conducta materna que se ha producido ha “mitigado” los supuestos efectos “negativos” del estrés. En el intento de encontrar efectos “negativos” no hemos podido estudiar los cambios epigenéticos del objetivo 3, y las muestras de semen se encuentran congeladas.

Respecto al objetivo 4, el estrés temprano no ha afectado el consumo de alcohol en la generación F2. La exposición al alcohol en los padres ha inducido efectos contradictorios en la autoadministración de alcohol de la F2, puesto que en un primer estudio se observó un efecto “protector” (disminución de la autoadministración de alcohol) y en el segundo estudio que hemos realizado (para replicar los efectos tan sorprendentes) no se ha encontrado dicho efecto “protector” (aunque tampoco negativo), si bien si parece que se induce un estado de anhedonia en la



descendencia (medido por la autoadministración operante de sacarina). Si esta disminución en la autoadministración de sacarina es anhedonia o indicativo de un enlentecimiento cognitivo está por determinar. La dosis de alcohol que se administraban los padres en el primer estudio (que era “voluntaria”) era menor que la que se administraban en el estudio 2, siendo este quizás el factor responsable de la diferencia de resultados (la exposición a dosis bajas sea “protectora” y a dosis más altas no).

Consideramos que tendríamos que realizar un tercer estudio replicando los datos del objetivo 4 en el que se expusiera a los padres a dos rangos de dosis de alcohol, y en el que se estudiara en la descendencia (además de la autoadministración de alcohol y de sacarina) los posibles efectos cognitivos del alcohol. Las muestras de semen están también congeladas y no hemos realizado el objetivo 5 a la espera de confirmar los datos conductuales.



METODOLOGÍA, PLAN DE TRABAJO Y ACTIVIDADES

A continuación se transcriben las actividades realizadas en cada uno de los tres periodos de seguimiento informados, para una mejor valoración:

Primer informe de seguimiento

Empezamos durante los 3 primeros meses estudiando el procedimiento de autoadministración de alcohol (Simms et al. 2010) con otras jaulas operantes antiguas (puesto que el pedido de las nuevas aún no había llegado) que no requiere adición de sacarosa a la solución (en contra del denominado “sucrose-fading”) y se realiza en sesiones nocturnas de 12 h. El procedimiento, tras la revisión de la literatura, nos parecía interesante puesto que no supone la introducción de una solución dulce, en teoría era más rápido y tenía la ventaja de poder ser realizado durante la noche, Sin embargo, los consumos de alcohol obtenidos no eran tan altos como los que conseguimos con el método de “sucrose-fading” y existían amplias diferencias individuales. Por este motivo decidimos en los estudios posteriores utilizar el método de “sucrose-fading”, utilizando sacarina en vez de sucrosa puesto que la primera no posee valor calórico que pueda interferir en los resultados.

Según lo previsto, hemos estado estos primeros meses haciendo también pruebas de la técnica de metilación. En este caso no ha habido ninguna incidencia.

Dentro de este primer año estaba también previsto empezar con los estudios de la primera generación (F1). Las madres gestantes (GD15) llegaron en febrero y los experimentos con las crías se han prolongado hasta la fase adulta, finalizando las últimas ratas en julio. En junio realizamos los análisis de radioinmunoensayo. En julio y agosto hemos empezado el análisis informático (video-tracking), conductual (análisis de videos) y estadístico.

Las valoraciones que se han realizado en las crías son básicamente las propuestas en el proyecto original con dos variaciones. La más importante es que aún no se ha estudiado el consumo de alcohol en las crías (cuando alcanzan la etapa adulta), puesto que supimos en enero que el procedimiento administrativo de compra de las jaulas se alargaría muchos meses y además los estudios piloto con el procedimiento nocturno de autoadministración de alcohol (que se podía realizar con nuestras otras jaulas viejas) no indicaban consumos de alcohol satisfactorios. Es importante partir de un número elevado de madres (para no tener más de 1 cría en cada grupo experimental que provenga de una misma madre), con lo que el número de crías que se obtienen es muy elevado y han de ser utilizadas para distintos experimentos (“cohortes”) simultáneamente. Necesariamente las cohortes han de realizar pruebas experimentales distintas (puesto que el número de aparatos de un mismo tipo es limitado y las horas del período de luz son también limitadas). De esta manera, se han realizado 5 cohortes donde se han medido las variables originales, más otras relacionadas con vulnerabilidad a la adicción: laberinto elevado en forma de cruz y respuesta de sobresalto acústico (“ansiedad”); comportamiento en la prueba de la natación forzada (“depresión”); adquisición, memoria, extinción y generalización del condicionamiento del miedo al contexto (“miedo”); actividad motora en ambientes nuevos y preferencia por la novedad (“novelty-seeking”); memoria de reconocimiento de objetos; pruebas de descuento por demora (“impulsividad cognitiva”) y 5CSRTT (“impulsividad motora”, “atención” y “perseverancia”). Evidentemente, en todas las cohortes se ha medido la conducta materna desarrollada tanto por la madre biológica, como por la “cuidadora” (la supuestamente “maltratadora”). Además, hemos medido la respuesta del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HHA) ante distintos estímulos



estresantes (laberinto elevado, condicionamiento del miedo, natación forzada).

Puesto que ciertos datos apuntaban a la posibilidad de que se consiguieran en ocasiones efectos “protectores” y no negativos del estrés temprano, no quisimos arriesgarnos a guardar crías para reproducir (y estudiar la F2), ni realizar en esta primera fase estudios histológicos y de metilación del DNA, hasta tener seguro el modelo a nivel conductual.

Probablemente esta fue la decisión más acertada, puesto que los primeros resultados indicaron: (1) en los grupos estresados (con restricción de material para realizar el nido), las madres biológicas realizan más y no menos conducta materna (como si se tratara de un mecanismo de compensación); (2) las “cuidadoras” no ejercen realmente pautas de “maltrato”, habiendo encontrado únicamente ciertas conductas de “stepping”, las cuales van disminuyendo a lo largo de los primeros 7 días postnatales; (3) cuando llegan a la etapa adulta las crías estresadas parecen estar más “adaptadas”: realizan menos conductas pasivas en la prueba de la natación forzada, son menos impulsivas, muestran un menor “novelty-seeking” y parecen tener una menor reactividad al estrés.

Coincidiendo con el inicio del análisis de estos datos, en julio de 2012 en el Congreso de la FENS se contactó con el grupo de A. Korosi quien utiliza el método de estrés que consiste en la restricción de material para realizar el nido. Nos comunicaron que es crítico para que el procedimiento funcione (aunque no se describa en la literatura) que se coloque una rejilla metálica en el suelo de la jaula, de forma que se impida el total acceso a dicho material. En nuestro caso colocábamos menos material pero el animal podía realizar un nido rudimentario, el cual probablemente ya era suficiente. Tras diversos meses de espera se consiguió la autorización de modificación de procedimiento por parte de la Comisión de Ética de la UAB (CEEAH) y de la Generalitat. Posteriormente cuando en setiembre llegaron ya las jaulas operantes definitivas de autoadministración de alcohol se empezó un estudio piloto utilizando el método de “saccharin-fading” para estar seguro que funcionan adecuadamente, etc.

Segundo informe de seguimiento

En el último informe de seguimiento se menciona que en el primer bloque de 30 madres se encontraron resultados muy interesantes, pero inesperados. El procedimiento de estrés infantil utilizado indujo en la etapa adulta efectos duales, en ciertas variables fisiológicas y conductuales efectos “protectores” y en otras efectos “negativos”, además, de forma sexo-dimórfica. En concreto, los resultados indicaron que el tratamiento induce un aumento de la ansiedad (laberinto elevado en forma de cruz), un aumento de la conducta compulsiva (en el five-choice serial reaction time task), una disminución de la atención (en la misma prueba) y un aumento de la exploración de objetos nuevos. Pero por otra parte, induce un aumento de las conductas activas en situaciones estresantes (en la prueba de natación forzada), una disminución de la reactividad endocrina del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HPA) ante situaciones de estrés, y una disminución de la impulsividad cognitiva (en la tarea de descuento por demora). Paralelamente, se observa que el estrés temprano induce un aumento de la conducta materna, efecto que probablemente “compensa” los supuestos efectos negativos del estrés.

Delante de este cuadro de resultados, se decide, como ya se comentó, cambiar el modelo de estrés temprano, haciéndolo supuestamente más intenso, al introducir una rejilla metálica en el suelo de la jaula e impedir completamente que se realice el nido. A pesar de esta modificación del procedimiento, se induce de nuevo una conducta materna compensatoria. En este segundo bloque



de animales se han realizado dos experimentos (en dos cohortes separadas, provenientes de las mismas madres). En uno de ellos se estudia la “saliencia incentiva” por ser una medida altamente relacionada con la vulnerabilidad a la conducta adictiva. Los resultados refuerzan el efecto “protector” del estrés temprano, al reducirse dicha saliencia incentiva (en hembras) en los animales estresados. Además, estos resultados concuerdan con el segundo experimento en el que en los animales estresados se muestra un menor poder reforzante de la sacarina (medido mediante la tarea del “breaking point”). Todo ello es de nuevo sugestivo de una menor vulnerabilidad a la adicción. En parte de estos animales se ha extraído el encéfalo y se ha realizado hibridación in situ de marcadores dopaminérgicos, por su relación con la adicción, y del CRF, por su relación con el estrés. Estos estudios de hibridación formarán parte de dos tesinas de Máster que se presentaron en setiembre de la anualidad correspondiente.

Al seguir encontrando efectos protectores y ante el coste (en tiempo) que supone la autoadministración operante de alcohol, decidimos seguir trabajando en la optimización del modelo conductual. Utilizamos un tercer modelo de estrés de intensidad más elevada, el cual consistió en la combinación de estrés materno con privación maternal impredecible. Aunque se observó de nuevo un incremento en la conducta materna (“compensación”), la intensidad del tratamiento hace predecir efectos “negativos”. En esta descendencia se han realizado cinco bloques de estudios:

1. En una cohorte se ha realizado un estudio simultáneo de: (1) activación del eje HPA inducida por el etanol, (2) laberinto elevado en cruz (como medida de ansiedad), (3) consumo de sacarina (como medida de anhedonia, marcador de depresión) y (4) autoadministración operante de alcohol. En la actualidad estamos en la fase 4, la cual dura varios meses, con lo que aún no podemos extraer conclusiones definitivas. De momento lo que es muy evidente es que las ratas hembra consumen más dosis de alcohol que las macho (paradigma FR3).
2. En otra cohorte, se han extraído los cerebros y se están realizando los estudios previstos de hibridación in situ.
3. En otra cohorte se han cruzado los animales, según lo previsto (ver “cohorte reproducción 1” en el proyecto original).
4. En otra cohorte se ha expuesto a los animales a una dieta líquida control, o bien a una dieta alcohólica isocalórica. Esto nos proporciona un total de 4 grupos (controles o con estrés temprano, dieta normal o alcohólica). Animales macho de los 4 grupos se han cruzado según lo previsto con hembras siempre controles. Esta cohorte corresponde a la original “cohorte reproducción”.
5. Parte de los animales han sido seleccionados al azar para la extracción del semen y su posterior estudio de metilación del DNA. Dicho trabajo se está realizando en colaboración con el Dr Joan Blanco, del Departamento de Biología Celular (Facultad de Biociencias, UAB). Finalmente hemos decidido colaborar con este grupo al disponer de más experiencia en el tema de la epigenética. Los estudios epigenéticos en cerebro están a la espera de los resultados de la hibridación, puesto que es más eficiente centrarse en aquellos genes en los que se observe un cambio en la expresión.

Tercer informe de seguimiento

Desde la entrega del último informe científico se solicitó dedicar parte del presupuesto de fungible a personal, cambio que fue amablemente concedido. Además se solicitó una prórroga para la finalización del proyecto.



Parte del personal que formaba parte inicialmente del proyecto o que se incorporó más tarde no pudo proseguir en el proyecto. En noviembre del 2014 se cerró el laboratorio conductual del Servicio de Estabulario puesto que se abrían las nuevas instalaciones del Servicio en otro edificio. Durante unos meses se hizo también imposible el trabajo con animal vivo.

A pesar de todos estos problemas finalizamos el experimento en marcha y realizamos un nuevo experimento con el objetivo de replicar unos resultados sorprendentes. En el experimento en marcha ya comentado en el último informe de seguimiento se obtuvo que la exposición al alcohol en los padres inducía en la descendencia una disminución (en vez de un aumento) en el consumo operante de alcohol. Debido a este resultado paradójico se diseñó otro experimento en el que se incluían animales en los que en la etapa adulta se estudiaba la autoadministración de alcohol y en otros (como control adicional, para estudiar que no se trataba de un déficit cognitivo generalizado) la autoadministración de sacarina. Además, se estudiaba la descendencia masculina y la femenina, y por supuesto animales cuyos padres ingerían alcohol (en la dieta) o bien eran controles. No se incluyó en este nuevo experimento descendencia de padres estresados puesto que anteriormente se había demostrado que el estrés temprano no afectaba la autoadministración de alcohol en la descendencia. Por lo tanto se realizaron un total de 8 grupos (2 sexos x 2 dietas de los padres x 2 tipos de soluciones que se autoadministran los hijos/as). Se midió también la conducta materna que las madres realizaban hacia su descendencia puesto que aunque las madres siempre eran controles (es decir, no consumían alcohol, para no complicar aún más los diseños) podrían cuidar de forma distinta a sus hijos por provenir de padres “alcoholizados”. De hecho se encontró que las madres manifestaban una menor conducta materna hacia sus hijos. En la etapa adulta se estudió la autoadministración operante de ambas soluciones mediante el procedimiento de “sacarina-fading” el cual tiene una duración de varios meses, finalizando con un procedimiento de extinción y de recaída inducida por CS (luz asociada a la administración del refuerzo). Los resultados no indicaron que se disminuyera el consumo de alcohol en los hijos (como en el experimento anterior), aunque sí que se encontró en machos que la exposición al alcohol en los padres disminuía la autoadministración de sacarina. En animales adicionales se estudió el consumo de sacarina en una prueba consumatoria de dos botellas, y no mostró una disminución en la preferencia por dicha solución, lo cual sugiere que más bien puede tratarse de un déficit cognitivo.

Si comparamos el experimento replicación con el anterior se observa que la dosis que los padres ingerían en la dieta en el experimento 1 era inferior a la del experimento 2, con lo que se tendría que realizar otro experimento adicional para comprobar si este es el factor crítico. Sin poder replicar estos resultados no nos atrevemos evidentemente a publicar aún el último bloque de nuestros estudios.

Ya hemos realizado las cuantificaciones de los análisis de ISH y el resultado más relevante es que el estrés temprano induce una reducción en los niveles del enzima sintético de la dopamina (tirosina-hidroxilasa) en el área tegmental ventral (no en la sustancia negra) cuando además del estrés temprano se sobre-impone en la etapa adulta un estímulo estresante severo (inmovilización en plancha). Esta reducción es consistente con un estado anhedónico.

En el laboratorio de las Dras Meritxell López-Gallardo y María Paz Viveros (Universidad Complutense) hemos estudiado por IHQ en el cerebro adulto de nuestros animales estresados en la infancia la expresión de marcados gliales y la expresión del receptor de cannabinoides tipo CB1. Los resultados globalmente indican también efectos protectores puesto que se observa en ambos sexos una disminución en el número de células GFAP+ en la capa polimórfica del giro dentado. En



todas las áreas analizadas el número de células Iba1+ tiende a disminuir en machos y a aumentar en hembras. También se observa una disminución en la expresión del receptor de cannabinoides CB1 en los machos tratados, especialmente en el área CA3 de la formación hipocampal.

Respecto a los cambios epigenéticos hemos realizado una colaboración con el Dr Joan Blanco (Departamento de Biología Celular, UAB) puesto que tiene amplia experiencia en el tema, y de momento tenemos las muestras de semen congeladas de dos experimentos a la espera de encontrar mayor consistencia en los cambios conductuales antes de proceder a realizar los análisis.



EN CASO DE FINANCIACIÓN DE ESTANCIA AVALADA POR EL NIDA, INDIQUE:

- **Objetivos alcanzados**
- **Actividades realizadas vinculadas con el proyecto**
- **Duración de la estancia**

NA



APLICABILIDAD Y UTILIDAD PRÁCTICA DE LOS RESULTADOS EN EL ÁREA DE LAS DROGODEPENDENCIAS
(solo en caso de memoria final)

Aunque los resultados no han sido concluyentes y requieran estudios adicionales, el cuerpo de conocimiento en el que se fundamentan las hipótesis y objetivos del proyecto indica que la exposición a drogas de abuso y a situaciones de estrés no induce únicamente efectos en la generación directamente expuesta a esos factores, sino que puede también ejercer efectos en las posteriores generaciones, sin exposiciones adicionales al factor en cuestión. El sentido de esos efectos parece aún difícil de predecir, y probablemente intervienen multitud de factores aún no bien caracterizados. Aunque ciertos estudios han sugerido que la exposición a drogas o a estrés temprano puede producir efectos “negativos” en generaciones posteriores, nuestros datos indican que en ocasiones estos efectos puedan ser en cierta forma “protectores”; es decir, se induzca una cierta programación temprana que permita un mejor “coping” ante dichos factores. Se requiere mucha más información adicional antes de aplicar estos datos a poblaciones humanas.



**TRANSFERENCIA Y DIFUSIÓN DE RESULTADOS A LA CIUDADANÍA: ACCIONES LLEVADAS A CABO
(en caso de memoria de segunda anualidad o de memoria final)**

1. Se han expuesto las líneas generales del proyecto en las sesiones realizadas durante el periodo 2011-2015 en el “Institut de Neurociències” (UAB), dirigidas a estudiantes de Institutos de Secundaria, dentro de las siguientes actividades: (1) Semana de la Ciencia, (2) Semana del Cerebro, (3) Escolab (Ayuntamiento de Barcelona).
2. Participación en la “Festa de la Ciència”. Ayuntamiento de Barcelona, 2012. Dirigida a público en general.
3. Conferencias en los Centros Cívicos “Elizalde” y “Golferichs”, 2013-2014. Dirigidas a público en general.
4. Conferencia en el Curso “El cerebro. La última frontera del conocimiento”, Instituto de Ciencias de la Educación, Actividades de Verano, UAB, 2014. Dirigida a Profesores de Secundaria.
5. En el twitter profesional @RoserNadal, entre otros temas, se informa a la ciudadanía de aspectos relacionados con el proyecto, como epigenética, adicción a drogas y efectos del estrés.
6. Difusión en las plataformas “UAB Divulga”.



**PATENTES U OTROS RESULTADOS EXPLOTABLES COMERCIALMENTE QUE SEAN CONSECUENCIA DEL
PROYECTO (solo en caso de memoria final)**

NA



**OTRAS SUBVENCIONES O RECURSOS (INCLUIDOS FONDOS PROPIOS) QUE FINANCIAN ESTE PROYECTO O
PENDIENTES DE RESOLUCIÓN (importe, procedencia y aplicación)**

Como en toda investigación ocurre, el funcionamiento general del laboratorio se nutre de infraestructura y otro material adquirido a través de los años por medio de otras fuentes de financiación y recursos. En nuestro caso el laboratorio se nutre de ayudas MICINN/MINECO, Redes Temáticas (ISCIII, FEDER), Generalitat de Catalunya (Grupos SGR e ICREA-ACADEMIA) y de fondos de la propia UAB.



**SUBVENCIONES O AYUDAS SOLICITADAS PARA ESTE PROYECTO Y NO CONCEDIDAS
(Organismo, convocatoria y cantidad)**

Para ampliar los objetivos de la temática del proyecto he intentado solicitar sin éxito otras fuentes complementarias a las siguientes entidades:

NARSAD (Brain and Behavior Research Foundation), 2013 “Independent Investigator Grant”

ERAB (European Foundation for Alcohol Research), 2013

Fundación Alicia Koplowitz, 2012, 2013



OTRAS CONSIDERACIONES QUE SE DESEE HACER CONSTAR

Además de las **dificultades científicas** que he tenido para la realización del proyecto ya comentadas (básicamente que los efectos a largo plazo del estrés temprano resultaban protectores y que los efectos en la descendencia del consumo de alcohol no se han replicado en el segundo experimento), me gustaría resaltar otras **dificultades no científicas** que ya he ido comentando en los informes de seguimiento, en la solicitud de partidas para personal y en la ampliación de la fecha de finalización del proyecto, que son las siguientes:

- (1) retraso en la adquisición de las jaulas de autoadministración de alcohol debidas al concurso público que se tuvo que realizar el cual tiene unos plazos muy largos,
- (2) retraso en la obtención del permiso de la Comisión de Ética de la Universidad y de la Generalitat, necesario porque se tuvo que solicitar una intervención estresante distinta en nuestros animales,
- (3) finalización del contrato de varios investigadores que participaron inicialmente en el proyecto e imposibilidad económica de renovarles dichos contratos,
- (4) retraso de 3 años en la obertura de los nuevos espacios de estabulación/laboratorio que habían sido concedidos, lo cual ha supuesto que se tuviera que trabajar con menos espacio del esperado.

Personalmente mi experiencia ha sido a pesar de estos problemas muy positiva. El tema a pesar de ser muy complejo es de una gran relevancia social. Los efectos protectores del estrés temprano y el aumento “compensatorio” de la conducta materna han sido muy consistentes, resultados que abren para mi toda una nueva línea de investigación muy poco explorada.

En esta fecha se remite también por correo electrónico a la dirección pndinvestigacion@msssi.es la presente memoria.

En Cerdanyola del Vallès a (Barcelona) a 14 de setiembre de 2015

NOMBRE Y FIRMA DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL

Roser Nadal Alemany